昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, July 2010, 53(7): 809 – 817 ISSN 0454-6296

昆虫包涵体衍生病毒囊膜蛋白的分子生物学

相兴伟，吴小锋*
(浙江大学动物科学学院，杭州 310029)

摘要：了解杆状病毒的囊膜蛋白对揭示病毒入侵、囊膜蛋白核定向转运机制以及研究控制昆虫新策略等方面具有重要意义。目前研究表明，包涵体衍生病毒(occlusion-derived virus，ODV)的囊膜蛋白包括 ODV-E25，ODV-E66，ODV-E56，ODV-E18，ODV-E28，P74，PIF1，PIF2，PIF3，GP41，ODV-EC27，ODV-E35，ODV-EC43，BV/ODV-E26，P91 和 ORF150。本文结合国内外的研究成果系统地综述了囊膜蛋白的结构和功能，其在经口感染、调节细胞周期和囊膜蛋白的传送等方面起作用。囊膜蛋白的核定向转运机制，ODV 与昆虫中肠之间和包涵体基质之间相互作用以及 ODV 结构蛋白之间的相互作用等将是今后的研究重点。

关键词：杆状病毒；包涵体衍生病毒；囊膜蛋白；基因敲除；核定向转运；昆虫中肠
中图分类号：Q965.8 **文献标识码**：A 文章编号：0454-6296(2010)07-0809-09

Molecular biology of the occlusion-derived virus envelope proteins

XIANG Xing-Wei, WU Xiao-Feng* (College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Studies on the baculovirus envelope proteins are important to reveal the mechanism of viral entry and nuclear transporting and targeting of the envelope proteins and also fundamental for the development of new strategies for insect control. Recent researches showed that the envelope proteins of occlusion-derived virus (ODV) include ODV-E25, ODV-E66, ODV-E56, ODV-E18, ODV-E28, P74, PIF1, PIF2, PIF3, GP41, ODV-EC27, ODV-E35, ODV-EC43, BV/ODV-E26, P91 and ORF 150. This article reviewed the recent research achievements about the structure and function of the baculovirus envelope proteins. Most envelope proteins are related to per os infection, cell cycle regulation, and the trafficking of envelope proteins. The mechanism of trafficking of ODV envelope proteins, their interaction with insect midgut and the OB matrix, and the protein-protein interaction of ODV structural proteins will be the focus of future research.

Key words: Baculovirus; occlusion-derived virus; envelope protein; gene knock-out; nuclear transporting; insect midgut

昆虫杆状病毒[以杆状病毒科(Baculoviridae)的代表种苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)为例]在其生活史中存在基因组完全相同、但结构和形态上不同的两种病毒粒子，出芽型病毒(budded virus, BV)和包涵体衍生病毒(occlusion-derived virus, ODV)。BV 可在病毒感染后早期大量产生，而 ODV 主要是感染晚期形成的包埋在多角体蛋白基质内的病毒粒子。这两种形式的病毒粒子在感染寄主过程中作用不同，BV 主要负责病毒在同一感染宿主内的水平传播，即在同一个体的不同组织和细胞间传播，而 ODV 在昆虫不同个体间和亲子代间的病毒垂直传播中发挥重要作用。这两种形式的病毒粒子在生物学功能上表现的差异主要由病毒粒子囊膜表面的蛋白质决定。BV 的囊膜蛋白主要在病毒核衣壳穿越宿主细胞膜时从细胞质膜上获得，而 ODV 在细胞核中获得囊膜，故 BV 和 ODV 的囊膜结构和表面蛋白有所不同。在原发感染的过程中，ODV 病毒粒子借囊膜与中肠上皮细胞微绒毛膜的融合作用脱去囊膜，核衣壳进入宿主细胞，引起感染，因此 ODV 的囊膜蛋白上含有决定宿主范围和原发感染的蛋白质因子。目前的研究

基金项目：国家自然科学基金项目(30871827)
作者简介：相兴伟，男，1986 年生，山东潍坊人，博士研究生，研究方向为家蚕杆状病毒分子生物学及其基因工程利用研究，E-mail：xxw11086@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 0571-86971658; E-mail: wuxiaofeng@zju.edu.cn
收稿日期 Received：2010-03-04；接受日期 Accepted：2010-07-08

表明，ODV 的囊膜蛋白包括 ODV-E25，ODV-E66，ODV-E56，ODV-E18，ODV-E28，P74，PIF1，PIF2，PIF3，GP41，ODV-EC27，ODV-E35，ODV-EC43，BV/ODV-E26，P91 和 ORF150，大多数囊膜蛋白是高度保守的，并且其编码基因是杆状病毒 30 种核心基因的成员（Herniou *et al.*，2003；Jehle *et al.*，2006），功能涉及到囊膜蛋白的传送、经口感染、核衣壳的形成及调节细胞周期等方面。本文参阅本领域近年的大量研究成果，结合国内外研究工作及自己的实验对 ODV 的囊膜蛋白进行了综述。

1 N-端定位于 ODV 囊膜上的蛋白

1.1 ODV-E25

odv-e25 基因（ORF 94，79 971 ~ 80 657 nt）长 687 bp，编码分子量 25.5 kDa 的由 228 个氨基酸残基组成的 ODV-E25。存在于所有鳞翅目的杆状病毒之中，并且是高度保守的（Herniou *et al.*，2003）。在病毒复制过程中，ODV-E25 于晚期表达并且经过酯酰化。该蛋白质的 N-末端存在一个由 20 个氨基酸残基组成的高度疏水域，该疏水域使 ODV-E25 定位于囊膜上（Hong *et al.*，1997）。ODV-E25 在 BV 中也存在，不过相对于 ODV 中的量而言是很少的（Russell and Rohrmann，1993）。对多种杆状病毒 ODV-E25 的研究表明：它是 ODV 囊膜内的特异性蛋白质，表达的蛋白出现于病毒发生基质（virogenic stroma）的外围，这种现象可能与 ODV-E25 在核内微泡中的积累相一致（Kawasaki *et al.*，2004）。另外有研究表明斜纹夜蛾核型多角体病毒（*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus，SpltMNPV）的 ODV-E25 是 ODV 囊膜蛋白，然而共聚焦显微检测法显示 ODV-E25 主要存在于感染细胞的细胞质内，由于很难解释这种现象，故 ODV-E25 可能还有其他未知功能（Li *et al.*，2006）。有研究人员尝试构建敲除 *odv-e25* 的重组黄杉毒蛾核型多角体病毒（*Orgyia pseudotsugata* multicapsid nucleopolyhedrovirus，OpMNPV）未获成功，这说明 ODV-E25 对病毒的复制是必需的（Funk *et al.*，1997）。目前，我们利用 Red 同源重组技术在家蚕核型多角体病毒（*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus，BmNPV）中成功地敲除了 *odv-e25*，发现其影响 BV 的感染力而且减少了多角体的形成数量。

1.2 ODV-E66

odv-e66 基因（ORF 46，36 718 ~ 38 832 nt）长 2 115 bp，编码分子量 66 kDa 的由 704 个氨基酸残基组成的 ODV-E66。转录起始于两个保守的 TAAG 序列，是一个晚期表达基因，在感染 12 ~ 72 h 后可检测到转录产物，感染 24 ~ 72 h 可检测到蛋白。ODV-E66 与 ODV-E25 相似，其也是 N-端存在 20 个氨基酸组成的高度疏水域，定位于囊膜上（Hong *et al.*，1997）。研究 ODV-E66 的过程中发现其特异性地定位于 ODV 囊膜蛋白上，不存在于 BV 中。ODV-E66 的位置早已确定，而其功能最近才知晓，研究表明 ODV-E66 是一种透明质酸酶，在原发感染中起到穿透胞外障碍的作用（Vigdorovich *et al.*，2007）。先前的研究表明 ODV-E66 并不重要，可以取代天然位点的 *odv-e66* 以形成重组病毒（Hong *et al.*，1997）。然而，对这些重组病毒进行更全面的分析表明 ODV-E66 能在感染细胞中再生，我们也试图在 BmNPV 中利用同源重组的方法构建完全敲除 *odv-e66* 的重组病毒没有成功，说明 *odv-e66* 是病毒的必需基因。

对 ODV-E66 的研究集中在 N-端的跨膜序列上，有研究表明其与 EGFP 融合表达时能传递融合蛋白到核内膜和 ODV 囊膜，其功能是作为 N-端信号肽（Braunagel *et al.*，2004）。另有研究发现在缺失 FP25K 的条件下，ODV-E66 传送至囊泡的数量减少（Braunagel *et al.*，1999；Rosas-Acosta *et al.*，2001）。共价交联实验表明了 FP25K 直接参与 ODV-E66 至核囊膜的传送，化学交联法研究表明 ODV-E66 的 N-端的跨膜序列邻近 FP25K 和 BV/ODV-E26，而且能与 ODV-E25 免疫共沉淀（Braunagel *et al.*，1999，2004），而 FP25K 和 BV/ODV-E26 与囊膜蛋白的传送有关（下文详述），因此 ODV-E66 在囊膜蛋白的传送过程中也起一定作用。酵母双杂交实验表明 ODV-E66 与衣壳蛋白 VP39 相互作用（Braunagel *et al.*，1999），近期对棉铃虫核型多角体病毒（*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus，HearNPV）的 ODV 相关蛋白进行酵母双杂交实验，检测到 ODV-E66 也能与 PIF2（per os infectivity factor 2，PIF2）和 PIF3（per os infectivity factor 3，PIF3）相互作用，目前缺少生物学实验数据证明 ODV-E66 也与经口感染有关（Peng *et al.*，2010）。

2 与经口感染有关的囊膜蛋白

2.1 P74

p74 基因（ORF 138，119 135 ~ 121 072 nt）长

1 938 bp，编码分子量 74 kDa 的由 645 个氨基酸残基组成的 P74。该基因位于 *p10* 基因下游，与 *p10* 基因转录方向相反。P74 是第一个被发现的对经口感染起重要作用的 ODV 囊膜蛋白（Yao *et al.*，2004；Zhou *et al.*，2005）。目前将识别的另外几个这样的蛋白命名为经口感染因子（per os infectivity factor，PIF），P74 可以看作是 PIF-0。P74 是高度保守的 ODV 囊膜蛋白，*p74* 基因是 30 个杆状病毒核心基因之一（Rashidan *et al.*，2003；Belaich *et al.*，2006）。P74 蛋白的 C-端存在一个跨膜序列，使其定位于 ODV 囊膜（Slack *et al.*，2001）。有研究表明 P74 结合 ODV 进入到昆虫中肠的最初靶细胞后，使 ODV 与中肠上皮细胞表面的特殊受体相结合（Horton and Burand，1993；Haas-Stapleton *et al.*，2004）。随后的研究表明与刷状缘囊泡膜结合的 P74 蛋白显示出饱和动力学机制，P74 结合的中肠膜蛋白大约 30 kDa（Zhou *et al.*，2005）。敲除 *p74* 的重组病毒与野生型相比，感染力下降了 10^5 倍，而 ODV 结合到中肠细胞的数量仅降低 3 倍。这说明 ODV 与中肠上皮细胞的结合并不能确保感染（Haas-Stapleton *et al.*，2004）。有研究表明在中肠的碱性条件下，P74 的 N-端裂解，这与其中含有保守的胰蛋白酶裂解位点是一致的，而且胰蛋白酶抑制剂能阻碍裂解，说明 P74 需要将 N-端裂解才能发挥作用（Slack and Lawrence，2005；Slack *et al.*，2008）。最近有研究证实，缺失 C-端跨膜域的 P74 仍具有经口感染的特性，能功能性地修复敲除 *p74* 的 AcMNPV（Slack *et al.*，2010）。有研究人员将 P74，P10 和 P26 一起敲除构建重组病毒，发现形成的多角体不再包含有病毒粒子，因此 P74 有可能与 P10 和 P26 相互作用直接介导 ODV 包埋进入多角体的过程（Wang *et al.*，2009）。

2.2 PIF1

pif1 基因（ORF 119，100 699 ~ 102 291 nt）长 1 593 bp，编码分子量 60 kDa 的由 530 个氨基酸残基组成的 PIF1。在利用灰翅夜蛾核型多角体病毒（*Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus，SpliNPV）研究病毒感染力的过程中发现 PIF1 是 ODV 的囊膜蛋白（Kikhno *et al.*，2002），PIF1 的 N-端跨膜序列与 ODV-E25 和 ODV-E66 的跨膜序列相似（Braunagel *et al.*，2004）。像 *p74* 一样，*pif1* 也是杆状病毒 30 个核心基因之一（Rashidan *et al.*，2003）。PIF1 不仅在 ODV 结合到中肠上皮细胞之后病毒 DNA 复制之前的这一阶段起作用，而且在 ODV 与中肠靶细胞结合和融合的过程中也起作用（Ohkawa *et al.*，2005）。当敲除 *pif1* 时，经口感染的能力明显下降（Gutiérrez *et al.*，2005）。像 P74 和 PIF1 在感染的细胞中表达的量也很少，PIF1 低水平的表达说明其在转录水平调控基因的表达（Braunagel *et al.*，2003）。P74 和 PIF1 的表达量很低解释了为什么在利用质谱分析 ODV 蛋白的过程中不能识别这两种蛋白。同理我们可以认为其他的 ODV 囊膜蛋白可能会由于相同的原因而不能被鉴定。

2.3 PIF2

pif2 基因（ORF 22，17 301 ~ 18 449 nt）长 1 149 bp，编码分子量 44 kDa 的由 382 个氨基酸残基组成的 PIF2。目前还没有直接的证据表明 PIF2 是 ODV 的囊膜蛋白，但其功能表明 PIF2 存在于 ODV 囊膜中。对敲除 *pif2* 的甜菜夜蛾核型多角体病毒（*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus，SeMNPV）和棉铃虫核型多角体病毒（*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus，HearNPV）的重组病毒进行研究，发现经口感染能力明显降低（Fang *et al.*，2006）。有研究表明 PIF2 介导昆虫中肠中 ODV 结合到最初的靶细胞（Ohkawa *et al.*，2005）。像 *pif1*，*pif2* 也是杆状病毒 30 个核心基因之一（Rashidan *et al.*，2003），而且其 N-端跨膜序列也与 ODV-E25 和 ODV-E66 的跨膜序列相似（Braunagel *et al.*，2004）。通过酵母双杂交实验，能检测到 PIF2 与 ODV-E66 和 PIF3 相互作用（Peng *et al.*，2010）。

2.4 PIF3

pif3 基因（ORF 115，99 182 ~ 99 796 nt）长 615 bp，编码分子量 23 kDa 的由 204 个氨基酸残基组成的 PIF3。在全面筛选家蚕 BmNPV 的突变体时识别了第 4 个 *pif* 基因（Ohkawa *et al.*，2005）。像其他的 *pif* 基因一样，*pif3* 也是 30 个杆状病毒核心基因之一（Rashidan *et al.*，2003）。Ohkawa 等（2005）发现 PIF3 与其他 PIF 蛋白不同，并不影响 ODV 与中肠靶细胞的结合和融合，推测 PIF3 介导一个目前仍未识别却是最初感染的关键因素的过程，通过制备 PIF3 的血清抗体，用 Western blotting 表明 PIF3 定位于 ODV 而不是 BV，其 N-末端存在一个由 20 个氨基酸残基组成的高度疏水域。酵母双杂交实验表明 PIF3 与 ODV-E66 和 PIF2 相互作用，而且其自身能相互作用（Peng *et al.*，2010）。

2.5 ORF 150

orf 150 基因（ORF 150，130 456 ~ 130 755 nt）

长 300 bp，编码分子量 11 kDa 的由 99 个氨基酸残基组成的 ORF 150。ORF 150 在 ODV 和 BV 的囊膜中都能检测到，其 N-末端存在一个由 20 个氨基酸残基组成的高度疏水域(Lapointe *et al*., 2004)。能构建敲除了 *orf 150* 的重组病毒，而且在体外实验和体内实验中都有感染力，说明 *orf 150* 不重要(Kawasaki *et al*., 2004)。通过经口感染和血淋巴注射的对比实验来研究野生型和敲除 *orf 150* 的重组病毒的毒力差别，结果在烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、斜纹夜蛾 *Spodoptera exigua* 和粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 的幼虫中重组病毒的毒力明显降低。ORF 150 通过提高原发感染的效率来影响毒力(Zhang *et al*., 2005)。因此，ORF 150 也可以分类为 PIF 因子，与其他的 PIF 因子不同，它起介导作用却不是经口感染必需的。

2.6 ODV-E28

odv-e28 基因(ORF 96，84 346 ~ 84 867 nt)长 522 bp，编码分子量 28 kDa 的由 173 个氨基酸残基组成的 ODV-E28。ODV-E28 的 N-端区域与其他 ODV 囊膜蛋白的 N-端区域相似，*odv-e28* 属于 30 个杆状病毒核心基因之一(Rashidan *et al*., 2003; Braunagel *et al*., 2004)，目前预测这种蛋白存在于 ODV 的囊膜中。先前研究表明家蚕 BmNPV 的 ORF 79 定位于 ODV 囊膜而且利用 SDS-PAGE 检测到 28 kDa 的蛋白(Xu *et al*., 2006)。最近有研究表明在 AcMNPV 中敲除 *ac96* 后不影响 BV 的感染力、病毒 DNA 的复制以及多角体的形成，但是使病毒丧失了经口感染的能力(Fang *et al*., 2009)

2.7 ODV-E56

odv-e56 基因(ORF 148，129 008 ~ 130 138 nt)长 1 131 bp，编码分子量 41 kDa 的由 376 个氨基酸残基组成的 ODV-E56。转录起始于保守的 ATAAG 序列，感染 16 ~ 72 h 可检测到转录产物，感染 36 h 后可检测到蛋白，蛋白转运及定位信号位于 C 末端，特异性的定位于 ODV 囊膜(Braunagel *et al*., 1996a)，其跨膜序列与 P74，PIF1，PIF2 和 PIF3 相似。*odv-e56* 在亲缘关系比较远的杆状病毒科中也是高度保守的属于 30 个杆状病毒核心基因之一(Rashidan *et al*., 2003)。对 OpMNPV 的 ODV-E56 进行 SDS-PAGE 能检测到 46 kDa 和 43 kDa 的蛋白，而对 AcMNPV 的 ODV-E56 进行 SDS-PAGE 检测到了 67 kDa 和 56 kDa 的蛋白(Braunagel *et al*., 1996a)。先前研究表明可以构建一个含有部分 *odv-e56* 的重组病毒，分析表明重组病毒既不影响 BV 的产生也不影响病毒 DNA 的复制，而且对 OB 的形态和产量以及包涵的 ODV 无影响(Braunagel *et al*., 1996a)。使 *odv-e56* 在多角体蛋白启动子的控制下表达(与野生型相比表达数量增加、表达延迟)时，共聚焦分析表明 ODV-E56 定位正常；电子显微镜观察没有出现正常包膜的 ODV，因此改变 ODV-E56 的化学计算量阻碍了 ODV 的成熟(Afonso *et al*., 2001)。而最近的研究表明，AcMNPV 的 ODV-E56 是经口感染必须的，而且可以被茶刺蛾核型多角体病毒(*Rachiplusia ou* multiple nucleopolyhedrovirus，RoMNPV)的 ODV-E56 功能性修复，因此也可以认为其是一种经口感染因子(Harrison *et al*., 2010)。ODV-E56 是经历过阳性选择的 Ⅰ 型 NPV 的 9 个基因中的一个，目前已经明确这种基因能提供种特异性的毒力因子并且能决定宿主范围(Harrison and Bonning, 2004)，另外酵母双杂交实验的结果表明 ODV-E56 与 38K 和 PIF3 相互作用(Peng *et al*., 2010)。我们将其与 EGFP 融合表达时，发现在纯化的多角体中能检测到融合蛋白，考虑到囊膜蛋白在细胞质表达，然后进入细胞核并被包埋进入多角体的特性，可以考虑将囊膜蛋白作为引导信号特异性的固定外源蛋白。

3 与细胞周期相关的囊膜蛋白

3.1 ODV-E18

odv-e18 基因(ORF 143，125 153 ~ 125 341 nt)长 189 bp，编码分子量 9.6 kDa 的由 62 个氨基酸残基组成的 ODV-E18。*odv-e18* 存在于所有的鳞翅目杆状病毒中，是 30 个杆状病毒核心基因之一(Rashidan *et al*., 2003)，转录起始于保守的 ATAAG 序列，是一个晚期表达基因，在感染 16 ~ 72 h 可检测到转录产物，定位于囊膜蛋白和病毒诱导的核内微泡，预测的蛋白分子量为 9.6 kDa，而在 SDS-PAGE 中检测到了 18 kDa 的蛋白，是因为经过了二级修饰，因此命名为 ODV-E18(Braunagel *et al*., 1996b; Rashidan *et al*., 2003)。ODV-E18 也是经历过阳性选择的 Ⅰ 型 NPV 的 9 个基因中的一个，因此也能决定宿主范围(Harrison and Bonning, 2004)。如果在多角体蛋白启动子下表达 *odv-e18*，那么自然位点的 *odv-e18* 就可删除，但不能进一步敲除多角体蛋白启动子下的 *odv-e18*。有研究表明敲除 *odv-e18* 的 AcMNPV 重组病毒感染细胞，荧光显微镜发现荧光在单个细胞中，滴定分析表明重组病毒不能产生有感染力的 BV，而在感染重组病毒

的细胞核中能形成正常的多角体，表明删除 *odv-e18* 不影响病毒的复制（McCarthy and Theilmann，2008）。

3.2 ODV-EC27

odv-e27 基因（ORF 144，125 357 ~ 126 229 nt）长 873 bp，编码分子量 33 kDa 的由 290 个氨基酸残基组成的 ODV-EC27。*odv-e27* 是杆状病毒 30 个核心基因之一（Rashidan *et al.*，2003），为晚期表达基因，转录起始于保守的 TAAG 序列，在感染 16 ~ 72 h 可检测到转录产物，存在于囊膜和核衣壳中，预测的蛋白分子量为 33 kDa，而在 SDS-PAGE 中检测到 27 kDa 的蛋白（Braunagel *et al.*，1996b；Rashidan *et al.*，2003）。ODV-EC27 与细胞周期蛋白的细胞周期蛋白盒区域有同源性，并且与细胞周期蛋白激酶 cdc2 和细胞周期蛋白激酶 cdc6 相关。cdc2 与细胞周期蛋白 B 形成复合体引起细胞 G_2/M 阶段的过渡，而在杆状病毒感染的晚期，细胞周期蛋白 B 快速降解，细胞进入 G_2/M 过渡停滞状态，这与 ODV-EC27 与 cdc2 相结合形成复合体是一致的，研究人员认为在感染的晚期阶段细胞停滞在 G_2/M 阶段对 ODV 的组装是非常重要的（Belyavskyi *et al.*，1998）。AcMNPV 在两个不同的时间点阻止 sf9 细胞循环的正常进行，AcMNPV 导致的细胞循环的停滞既不需要病毒 DNA 的复制也不需要病毒晚期基因的表达。处于 ODV 侵染状态下随后进行病毒复制的中肠细胞处于细胞复制周期的 G_0 状态，因此病毒 DNA 复制所需要的细胞因子或者不存在或者处于抑制状态（Ikeda and Kobayashi，1999）。ODV-EC27 与 cdc6 形成复合体还能与病毒编码的细胞核增殖抗原（proliferating cell nuclear antigen，PNCA）相结合，推测 ODV-EC27 与 cdc6 形成复合体与中肠细胞相互作用，有利于细胞以 S-型曲线生长，从而使病毒 DNA 在最佳条件下复制。研究人员利用敲除了 *odv-e27* 的 AcMNPV 重组病毒感染细胞时发现，删除 *odv-e27* 不影响病毒 DNA 的复制，而核衣壳的数量显著减少，认为 *odv-e27* 与 DNA 的加工、组装以及核衣壳的形成有关（Vanarsdall *et al.*，2007）。酵母双杂交实验表明 ODV-EC27 与衣壳蛋白 BV/ODV-C42 和 PP78/83（核衣壳基底结构蛋白）相互作用，而 BV/ODV-C42 介导 PP78/83 的传送（Braunagel *et al.*，2001），而且删除 *Bm41* 后既影响 ODV-EC27 的表达，也影响正常核衣壳的包膜和多角体的形成（Tian *et al.*，2009），因此 ODV-EC27 不仅与细胞周期调节有关，而且与核衣壳的形成，正常包膜以及多角体的形成有关。

3.3 ODV-E35

关于 ODV-E35 的研究报道很少。有研究人员在用 ODV-E18 和 ODV-EC27 的特异性抗体对感染 AcMNPV 的细胞的提取物进行 Western blotting 分别检测到 18 kDa 和 27 kDa 的特异性条带，而对纯化的 ODV 囊膜蛋白进行 Western blotting 能检测到 18 kDa 和 35 kDa 的特异性条带以及 27 kDa 和 35 kDa 的特异性条带（Braunagel *et al.*，1996b），利用 ODV-E18 和 ODV-EC27 的抗体能检测到分子量为 35 kDa 的蛋白是 ODV-E35 存在的唯一证据。对 ODV-E35 的序列研究分析表明，它与 ODV-E18 的 N-末端序列是一样的。免疫金标记发现 ODV-E18 和 ODV-E35 都出现在病毒诱导的核内微泡上，而在基质膜、细胞质膜和核囊膜上却没有检测到。前面提到 ODV-EC27 与 BV/ODV-C42 和 PP78/83 相互作用，ODV-E35 可能使囊膜与核衣壳蛋白相互交联而稳定 ODV 病毒粒子。

4 与衣壳相互作用的囊膜蛋白

4.1 GP41

gp41 基因（ORF 80，65 607 ~ 66 836 nt）长 1 230 bp，编码分子量 45 kDa 的由 409 个氨基酸残基组成的 GP41。*gp41* 作为晚期表达的基因，转录起始于两个保守的 TAAG 序列，是杆状病毒 30 个核心基因之一（Rashidan *et al.*，2003），GP41 是 ODV 囊膜的结构蛋白，存在于囊膜和衣壳之间的区域，氨基酸序列中不含疏水区，但有 *O*-连接的 GlcNAc 糖苷化位点，是杆状病毒 ODV 囊膜中唯一糖基化的囊膜蛋白，而该糖蛋白在 BV 中未发现（Liu and Maruniak，1999；Rashidan *et al.*，2003；Jain and Das，2004；Pan *et al.*，2005）。改变 AcMNPV *gp41* 的一个核苷酸，使其氨基酸发生改变后发现被感染的昆虫细胞中没有 BV 的产生，表明 GP41 虽然不存在于 BV 中，但仍参加了 BV 的形成过程（Olszewski and Miller，1997）。突变分析表明 GP41 是 BV 的核衣壳从核进入到基质膜必需的，而且敲除 *gp41* 只能形成一种对温度敏感的突变体，表明 *gp41* 非常重要（Olszewski and Miller，1997）。酵母双杂交实验表明 GP41 与 38K 和 HA90 相互作用，表明其与核衣壳的正常形成有关（Peng *et al.*，2010）。

4.2 ODV-EC43

odv-ec43 基因(ORF 109, 94 721 ~95 893 nt)长 1 173 bp, 编码分子量 45 kDa 的由 390 个氨基酸残基组成的 ODV-EC43。Fang 等(2003)鉴定棉铃虫单核衣壳核型多角体病毒(*Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, HaSNPV)的 ORF 98 为 AcMNPV ORF 109 的同源基因, 它编码一个在囊膜和核衣壳中都存在的 ODV 蛋白, 将其命名为 ODV-EC43。Braunagel 等(2003)利用 MADLI-TOF 和 MS/MS 光谱测定法鉴定了 ORF 109 编码 ODV 蛋白。*odv-ec43* 是杆状病毒 30 个核心基因之一, 说明其在感染过程中起重要作用(Rashidan *et al.*, 2003)。Fang 等(2009)在 AcMNPV 中敲除 *odv-ec43* 后发现, 其不影响病毒 DNA 的复制, 但是导致产生的 BV 没有感染力, 表明其与 BV 的感染力有关。Lin 等(2009)研究表明敲除 *odv-ec43* 后影响核衣壳的正常形成。

4.3 P91

p91 基因(ORF 83, 67 884 ~70 427 nt)长 3 543 bp, 编码分子量 91 kDa 的由 1 180 个氨基酸残基组成的 P91。*p91* 是杆状病毒 30 个核心基因之一, 说明它在感染过程中起重要作用(Rashidan *et al.*, 2003)。在利用 ODV 血清抗体筛选 OpMNPV 表达文库的过程中鉴定了 P91, SDS-PAGE 发现存在 91 kDa 和 102 kDa 两种分子量。P91 并不是特异性的存在于 ODV 囊膜上, 在 BV 中也以分子量 91 kDa 的形式存在(Russell and Rohrmann, 1997)。共聚焦显微检测到 P91 在感染的细胞核中, 免疫电子显微镜检测到 P91 存在于 ODV 的衣壳和囊膜中(Russell and Rohrmann, 1997)。一个 P91-GFP 融合蛋白表明 p91 与其他 ODV 囊膜蛋白相似, 也在核的核膜区域积累, 而且其 N-端跨膜区域与其他的 ODV 囊膜蛋白相似(Saksena *et al.*, 2006)。目前仍不了解 p91 在 BV 和 ODV 中的功能。

5 与囊膜蛋白传送有关的蛋白 BV/ODV-E26

bv/odv-e26 基因(ORF 16, 13 092 ~13 769 nt)长 690 bp, 编码分子量 26 kDa 的由 229 个氨基酸残基组成的 BV/ODV-E26。E26 仅存在于大约一半的杆状病毒基因组的序列中, Beniya 等(1998)认为 *bv/odv-e26* 编码杆状病毒的一个结构蛋白, 参与组成 BV 和 ODV 的囊膜, 将其命名为 BV/ODV-E26(E26), 在感染早期, 它结合于质膜膜泡, 感染 16 h 后, 在细胞核中与病毒诱导的核内微泡和 ODV 囊膜相关联(Beniya *et al.*, 1998)。随后有研究表明家蚕 *orf8* 编码一种在核中积累的蛋白(E26 的同源物)与 IE1 协同定位并结合于核酸上, 而且不能构建敲除 *Bmorf8* 的重组病毒(Imai *et al.*, 2004)。最近获得数据表明 E26 的不同亚型存在于感染的细胞中, 而且不同的亚型存在于不同的表位上, 这些能由细菌产生的血清抗体或者病毒产生的抗原来区分。E26 的一种亚型与病毒 DNA 和病毒结合蛋白有关, 另一种亚型的 E26 与核内膜有关, E26 可能通过棕榈酰化介导膜融合(Burks *et al.*, 2007)。质谱分析表明 E26 与微粒体膜有关(内质网膜的主要构成成分), E26 产生的抗体沉淀细胞的 importin-α-16 蛋白, 它们仅有有限相似的氨基酸, 却享有共同的抗原表位(Braunagel *et al.*, 2004)。共价交联实验表明, FP25K 和 BV/ODV-E26 参与囊膜蛋白的传送过程, 在囊膜蛋白穿过核膜, 到达内部核膜进而结合到病毒诱导的核内微泡的过程中起作用(Braunagel *et al.*, 2009)。利用串联亲和纯化技术(tandem affinity purification, TAP)和免疫共沉淀表明 BV/ODV-E26 与 IE0 和 IE1 相互作用, 并利用酵母双杂交系统获得了相互作用的区域, 并能调节 IE0 和 IE1 的表达水平(Nie *et al.*, 2009),因此 BV/ODV-E26 不仅与囊膜蛋白的传送有关, 而且与晚期基因的表达和 DNA 的复制有关。

6 结语与展望

目前对杆状病毒的研究大部分集中在 BV 上, 而对 ODV 的研究较少, 这是因为可以在细胞水平上对 BV 的功能进行探索, 而研究 ODV 的功能需要饲养昆虫, 而饲养条件不易控制; 培养昆虫细胞的微环境可以确定, 而昆虫的中肠比较复杂而且有许多生物学功能是未知的; 相对于 BV 而言, ODV 要复杂很多, 与 ODV 相关的蛋白多达 44 种, 功能涉及到病毒 DNA 的组装、核衣壳的转运、DNA 的复制和 DNA 的修复以及原发感染等。研究 ODV 的囊膜蛋白对揭示囊膜蛋白的核定向转运机制具有重要科学意义。目前利用哺乳动物的病毒模型揭示分泌途径的分子机制得到了快速发展, 在感染过程中, 感染了病毒的细胞转变为分泌细胞而大量的表达囊膜蛋白并传送到特定区域, 而杆状病毒提供了一个特殊的方法来研究结合膜蛋白从内质网膜到核囊膜

的传送。研究 ODV 囊膜蛋白的传送机制可以揭示许多令人疑惑的现象，考虑到囊膜蛋白存在于许多病菌中，那么了解囊膜蛋白的传送机制对人类的健康具有重要的意义。

目前对杆状病毒与昆虫中肠之间的生物化学和物理方面的相互作用探索较少，而这方面的知识是发展新的基因方法来控制昆虫的基础。既然 ODV 负责昆虫中肠的最初识别和侵染，那么研究 ODV 囊膜蛋白应该能为发展新的基因方法来控制昆虫提供新的思路。另外，所有的带菌昆虫的细菌通过中肠侵染昆虫，之后进行繁殖并传送到易感寄主。正因为如此，了解了 ODV 的侵染方式以及随后的相互作用，能为控制有害昆虫提供干预策略。

包涵体的形成是杆状病毒特有的生物学特性，而且包涵体是一个理想的固定外源蛋白的工具，通俗地讲，即开发包涵体作为外源蛋白的“贮藏仓库”，在需要时再将蛋白质释放出来。而 ODV 病毒粒子是如何包装进入包涵体，以及 ODV 与包涵体蛋白基质之间是如何相互作用的到目前还不了解。研究 ODV 的囊膜蛋白将会为这一机制的阐明提供资料。了解了包涵体形成的分子机制不仅能够更全面的解释杆状病毒的生物学特性，并将有效解决蛋白质不稳定和难于长期保存的问题，并有望在固定毒素蛋白、开发新型“生物杀虫剂”，以及开发基因治疗新型载体和新型纳米技术等领域发挥重要作用。

参 考 文 献 (References)

Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Balinsky CA, Moser BA, Becnel JJ, Rock DL, Kutish F, 2001. Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *J. Virol.*, 75: 11157 – 11165.

Belaich MN, Rodríguez VA, Bilen MF, Pilloff MG, Romanowski V, Sciocco-Cap A, Ghiringhelli PD, 2006. Sequencing and characterisation of *p74* gene in two isolates of *Anticarsia gemmatalis* MNPV. *Virus Genes*, 32: 59 – 70.

Belyavskyi M, Braunagel SC, Summers MD, 1998. The structural protein ODV-EC27 of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus is a multifunctional viral cyclin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11205 – 11210.

Beniya H, Braunagel SC, Summers MD, 1998. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: Subcellular localization and protein trafficking of BV/ODV-E26 to intranuclear membranes and viral envelopes. *Virology*, 240: 64 – 75.

Braunagel SC, Burks JK, Rosas-Acosta G, Harrison RL, Ma H, Summers MD, 1999. Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *J. Virol.*, 73: 8559 – 8570.

Braunagel SC, Cox V, Summers MD, 2009. Baculovirus data suggest a common but multifaceted pathway for sorting proteins to the inner nuclear membrane. *J. Virol.*, 83: 1280 – 1288.

Braunagel SC, Elton DM, Ma H, Summers MD, 1996a. Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. *Virology*, 217: 97 – 110.

Braunagel SC, Guidry PA, Rosas-Acosta G, Engelking L, Summers MD, 2001. Identification of BV/ODV-C42, an *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *orf101*-encoded structural protein detected in infected-cell complexes with ODV-EC27 and p78/83. *J. Virol.*, 75: 12331 – 12338.

Braunagel SC, He H, Ramamurthry P, Summers MD, 1996b. Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27. *Virology*, 222: 100 – 114.

Braunagel SC, Russell WK, Rosas-Acosta G, Russell DH, Summers MD, 2003. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 9797 – 9802.

Braunagel SC, Summers MD, 2007. Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. *Current Drug Targets*, 8: 1084 – 1095.

Braunagel SC, Williamson ST, Saksena S, Zhong Z, Russell WK, Russell DH, Summers MD, 2004. Trafficking of ODV-E66 is mediated *via* a sorting motif and other viral proteins: Facilitated trafficking to the inner nuclear membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 8372 – 8377.

Burks JK, Summers MD, Braunagel SC, 2007. BV/ODV-E26: a palmitoylated, multifunctional structural protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 361: 194 – 203.

Fang M, Nie Y, Harris S, Erlandson MA, Theilmann DA, 2009. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene *ac96* encodes a per os infectivity factor (*pif-4*). *J. Virol.*, 83: 12569 – 12578.

Fang M, Nie Y, Theilmann DA, 2009. Deletion of the AcMNPV core gene *ac109* results in budded virions that are non-infectious. *Virology*, 389: 66 – 74.

Fang M, Nie Y, Wang O, Deng F, Wang R, Wang H, Wang H, Vlak JM, Chen X, Hu Z, 2006. Open reading frame 132 of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus encodes a functional per os infectivity factor (PIF-2). *J. Gen. Virol.*, 87: 2563 – 2569.

Fang M, Wang H, Wang H, Yuan L, Chen X, Vlak JM, Hu Z, 2003. Open reading frame 94 of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus encodes a novel conserved occlusion-derived virion protein, ODV-EC43. *J. Gen. Virol.*, 84: 3021 – 3027.

Gutiérrez S, Mutuel D, Grard N, Cerutti M, López-Ferber M, 2005. The deletion of the *pif* gene improves the biosafety of the baculovirus-based technologies. *J. Biotechnol.*, 116: 135 – 143.

Haas-Stapleton EJ, Washburn JO, Volkman LE, 2004. P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus

occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. *J. Virol.*, 78: 6786 - 6791.

Harrison RL, Bonning BC, 2004. Application of maximum-likelihood models to selection pressure analysis of group I nucleopolyhedrovirus genes. *J. Gen. Virol.*, 85: 197 - 210.

Harrison RL, Sparks WO, Bonning BC, 2010. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 envelope protein is required for oral infectivity and can be functionally substituted by *Rachiplusia ou* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56. *J. Gen. Virol.*, 91: 1173 - 1182.

Herniou EA, Olszewski JA , Cory JS, O' Reilly DR, 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annu. Rev. Entomol.*, 48: 211 - 234.

Hong T, Summers MD, Braunagel SC, 1997. N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4050 - 4055.

Horton HM, Burand JP, 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry *via* direct membrane fusion. *J. Virol.*, 67: 1860 - 1868.

Ikeda M, Kobayashi M, 1999. Cell-cycle perturbation in Sf9 cells infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 258: 176 - 188.

Imai N, Kurihara M, Matsumoto S, Kang WK, 2004. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *orf8* encodes a nucleic acid binding protein that colocalizes with IE1 during infection. *Arch. Virol.*, 149: 1581 - 1594.

Jain M, Das RH, 2004. Nucleotide sequence and molecular characterization of the structural glycoprotein *gp41* gene homologue of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrosis virus (spltNPV-I). *Mol. Biol. Rep.*, 31: 231 - 239.

Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Theim SM, Vlak JM, 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.*, 151: 1257 - 1266.

Kawasaki Y, Matsumoto S, Nagamine N, 2004. Analysis of baculovirus IE1 in living cells: Dynamics and spatial relationships to viral structural proteins. *J. Gen. Virol.*, 85: 3575 - 3583.

Kikhno I, Gutierrez S, Croizier L, Croizer G, Lopez-Ferber M, 2002. Characterization of *pif*, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.*, 83: 3013 - 3022.

Lapointe R, Popham HJ, Straschil U, Goulding D, O'Reilly DR, Olszewski JA, 2004. Characterization of two *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus proteins, Ac145 and Ac150, which affect oral infectivity in a host-dependent manner. *J. Virol.*, 78: 6439 - 6448.

Li Z, Pan L, Yu H, Li S, Zhang G, Pang Y, 2006. Identification and characterization of *odv-e25* of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes*, 32: 13 - 19.

Lin L, Wang J, Deng R, Ke J, Wu H, Wang X, 2009. *ac109* is required for the nucleocapsid assembly of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virus Res.*, 144: 130 - 135.

Liu JC, Maruniak JE, 1999. Molecular characterization of genes in the GP41 region of baculoviruses and phylogenetic analysis based upon GP41 and polyhedrin genes. *Virus Res.*, 64: 187 - 196.

McCarthy CB, Theilmann DA, 2008. AcMNPV *ac143* (*odv-e18*) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene. *Virology*, 375: 277 - 291.

Nie Y, Fang M, Theilmann DA, 2009. AcMNPV AC16 (DA26, BV/ODV-E26) regulates the levels of IE0 and IE1 and binds to both proteins *via* a domain located within the acidic transcriptional activation domain. *Virology*, 385: 484 - 495.

Ohkawa T, Washburn JO, Sitapara R, Sid E, Volkman LE, 2005. Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of *pif* genes *Ac119* and *Ac022* but not by *Ac115*. *J. Virol.*, 79: 15258 - 15264.

Olszewski J, Miller LK, 1997. A role for baculovirus GP41 in budded virus production. *Virology*, 233: 292 - 301.

Pan L, Li Z, Gong Y, Yu M, Yang K, Pang Y, 2005. Characterization of *gp41* gene of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Res.*, 110: 73 - 79.

Peng K, Wu M, Deng F, Song J, Dong C, Wang H, Hu Z, 2010. Identification of protein-protein interactions of the ODV associated proteins of HearNPV. *J. Gen. Virol.*, 91: 659 - 670.

Rashidan KK, Nassoury N, Tazi S, Giannopoulos PN, Geurtin C, 2003. *Choristoneura fumiferana* granulovirus P74 protein, a highly conserved baculoviral envelope protein. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 36: 475 - 487.

Rosas-Acosta G, Braunagel SC, Summers MD, 2001. Effects of deletion and overexpression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *fp25k* gene on synthesis of two occlusion-derived virus envelope proteins and their transport into virus-induced intranuclear membranes. *J. Virol.*, 75: 10829 - 10842.

Russell RL, Rohrmann GF, 1993. A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions. *Virology*, 195: 532 - 540.

Russell RL, Rohrmann GF, 1997. Characterization of P91, a protein associated with virions of an *Orgyia pseudotsugata* baculovirus. *Virology*, 233: 210 - 223.

Saksena S, Summers MD, Burks JK, Johnson AE, Braunagel SC, 2006. Importin-alpha-16 is a translocon-associated protein involved in sorting membrane proteins to the nuclear envelope. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13: 500 - 508.

Slack JM, Dougherty EM, Lawrence SD, 2001. A study of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV envelope protein P74 using a GFP tag. *J. Gen. Virol.*, 82: 2279 - 2287.

Slack JM, Lawrence SD, 2005. Evidence for proteolytic cleavage of the baculovirus occlusion-derived virion envelope protein P74. *J. Gen. Virol.*, 86: 1637 - 1643.

Slack JM, Lawrence SD, Krell PJ, Arif BM, 2008. Trypsin cleavage of the baculovirus occlusion-derived virus attachment protein P74 is

prerequisite in per os infection. *J. Gen. Virol.*, 89: 2388 – 2397.

Slack JM, Lawrence SD, Krell PJ, Arif BM, 2010. A soluble form of P74 can act as a per os infectivity factor to the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *J. Gen . Virol.*, 91: 915 – 918.

Tian CH, Zhao JF, Xu YP, Xue J, Zhang BQ, Cui YJ, Zhang MJ, Bao YY, Zhang CX, 2009. Involvement of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF41 (*Bm41*) in BV production and ODV envelopment. *Virology*, 387: 184 – 192.

Vanarsdall AL, Pearson MN, Rohrmann GF, 2007. Characterization of baculovirus constructs lacking either the Ac 101, Ac 142, or the Ac 144 open reading frame. *Virology*, 367: 187 – 195.

Vigdorovich V, Miller DA, Strong RK, 2007. Ability of hyaluronidase 2 to degrade extracellular hyaluronan is not required for its function as a receptor for Jaagsiekte sheep retrovirus. *J. Virol.*, 81: 3124 – 3129.

Wang L, Salem TZ, Campbell DJ, Turney CM, Kumar CM, Cheng XW, 2009. Characterization of a virion occlusion-defective *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus mutant lacking the p26, p10 and p74 genes. *J. Gen. Virol.*, 90: 1641 – 1648.

Xu HJ, Yang ZN, Wang F, Zhang CX, 2006. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF79 encodes a 28-kDa structural protein of the ODV envelope. *Arch. Virol.*, 151: 681 – 695.

Yao L, Zhou W, Xu H, Zheng Y, Qi Y, 2004. The *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus envelope protein P74 is required for infection of the host midgut. *Virus Res.*, 104: 111 – 121.

Zhang JH, Ohkawa T, Washburn JO, Volkman LE, 2005. Effects of Ac 150 on virulence and pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in noctuid hosts. *J. Gen. Virol.*, 86: 1619 – 1627.

Zhou W, Yao L, Xu H, Yan F, Qi Y, 2005. The function of envelope protein P74 from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in primary infection to host. *Virus Genes*, 30: 139 – 150.

（责任编辑：赵利辉）